

## **PRESERVACIÓN ESPERMÁTICA A CORTO PLAZO Y EFECTOS EN LA FERTILIZACIÓN Y LARVA RESULTANTE *DE SCARUS TAENIOPTERUS* DESMAREST, 1831 (TELEOSTEI: SCARIDAE)**

**Short-term sperm preservation and effects on fertilization and resulting larva of *Scarus taeniopterus* Desmarest, 1831 (Teleostei: Scaridae)**

*Renson Padilla<sup>1</sup>, Beatriz Villarroel<sup>1</sup>, Ernesto Mata<sup>2</sup> y Pedro Rodríguez<sup>1\*</sup>*

### **Resumen**

La preservación de semen de peces a corto plazo, es una alternativa simple, barata y de fácil aplicación en la acuicultura y en la conservación de especies como por ejemplo los pertenecientes a la familia Scaridae, que poseen una gran importancia ecológica en los ecosistemas coralinos. En esta investigación se determinaron los efectos de la preservación espermática a corto plazo sobre la fertilización y la larva temprana resultante de *Scarus taeniopterus*, utilizando la solución de hidratación oral (Hidratarvin®) a dos temperaturas y cuatro tiempos de preservación. El diseño experimental consistió en dos tratamientos: preservación de espermias en refrigeración (10 °C; T1) y a temperatura ambiente (30 ± 1°C; T2) en cuatro tiempos de fertilización. El T1 presentó los mayores porcentajes de fertilización con relación al T2. En general, el porcentaje de fertilización en el semen preservado (T1 y T2) disminuyó significativamente a medida que aumentó el tiempo de preservación espermática y la temperatura. Las larvas de *S. taeniopterus* resultantes del T1 presentaron mayor longitud total y notocordal en comparación con las del T2. Sin embargo, resultaron ser menores al ser comparados con el tratamiento control. Aunque se observaron óptimos porcentajes de fertilización en este trabajo, la eclosión de larvas y su desarrollo se vio afectada por el tiempo de preservación espermática, lo que se debe posiblemente a la fragmentación del ADN espermático producto de la preservación, lo que puede influir fuertemente en el desarrollo normal del embrión y la integridad de la larva.

**Palabras clave:** semen, conservación, fecundación, embrión, pez loro.

[1] Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar. Universidad de Oriente [2] Laboratorio de Cultivo de Plancton: Universidad de Oriente, Núcleo de Nueva Esparta, Isla de Margarita, Venezuela. \*Correo electrónico: pedrodriguezr34@gmail.com

## Abstract

The short-term preservation of fish semen is a simple, cheap and easy-to-apply alternative in aquaculture and in the conservation of species such as those belonging to the family Scaridae, which have great ecological importance in coral ecosystems. In this research, the effects of short-term sperm preservation on fertilization and the resulting early larvae of *Scarus taeniopterus* were determined, using the oral hydration solution (Hidratarvin®) at two temperatures and four preservation times. The experimental design consisted of two treatments: preservation of sperm in refrigeration (10 °C; T1) and at room temperature (30 ± 1 °C; T2) in four fertilization times. T1 presented the highest percentages of fertilization in relation to T2. In general, the percentage of fertilization of the preserved semen (T1 and T2) decreased significantly as the sperm preservation time and temperature increased. The resulting *S. taeniopterus* larvae from T1 had greater total and notochordal length compared to those from T2. However, they turned out to be lower when compared to the control treatment. Although optimal fertilization percentages were observed in this work, the hatching of larvae and their development was affected by the sperm preservation time, this is possibly due to the fragmentation of sperm DNA produced by preservation, which can strongly influence in the normal development of the embryo and the integrity of the larva.

**Keywords:** semen, conservation, fertilization, embryo, parrotfish.

## Introducción

En la actualidad, la criopreservación se ha convertido en una herramienta biotecnológica ampliamente utilizada en la acuicultura y en la conservación de especies porque permite el mantenimiento de gametos a largo plazo, sin embargo, es un método complejo, caro y con costos de manutención elevados (Billard, 1990; Bustamante-González *et al.* 2019). Por esta razón, se han invertido esfuerzos en la búsqueda de otras técnicas más sencillas y económicas que permitan igualmente la preservación de espermatozoides. En este sentido, resultados provenientes de investigaciones, revelan la posibilidad de la conservación de semen de peces a corto

plazo, como una alternativa simple, barata y técnicamente de fácil aplicación en sistemas comerciales de cultivo (Muñoz, 2011). Una ventaja, por tratarse de un procedimiento económico, es que no necesita de soluciones crioprotectoras, lo cual posibilita el enfriamiento en temperaturas de refrigeración (1 – 15 °C), que a su vez facilita el manejo reproductivo y aumenta la eficiencia de la reproducción artificial, permitiendo inclusive la conservación del semen en refrigeradores domésticos, sin necesidad de un diluyente especial (Marques y Pereira, 2004; Carneiro, 2007).

Algunos estudios sobre la preservación espermática a corto plazo se han llevado a cabo en el orden Characiformes (Marques y Pereira, 2004; Viveiros *et al.* 2006), bagres

(*Leiarius marmoratus*) y sierras (*Oxidoras sifontesi*) (Poleo y Mora, 2008), y truchas o salmones del género *Oncorhynchus* (Sahin *et al.* 2013; Trigo *et al.* 2014).

De cualquier forma, se debe tomar en cuenta que los protocolos de preservación espermática varían con cada especie, debido a que los factores que activan la motilidad espermática, la duración de ésta y el patrón de actividad flagelar pueden diferir (Valdebenito *et al.* 2009; Bustamante-González *et al.* 2019).

Por ello, considerando la importancia ecológica que poseen los miembros de la familia Scaridae para los ecosistemas de arrecifes de coral, como bioerosionadores a través de la producción y distribución de arena de coral, y como herbívoros que controlan el crecimiento excesivo de algas, grupo dominante en el mar Caribe (Annandale *et al.* 2013; Mumby *et al.* 2006), resulta relevante desarrollar el protocolo adecuado para el almacenamiento a corto plazo del esperma de este grupo de organismos, por considerarse una estrategia útil para mejorar los programas de conservación de especies (Aguilar-Juárez *et al.* 2014; Trigo *et al.* 2014). Bajo esta premisa, se busca determinar los efectos de la preservación espermática a corto plazo sobre la fertilización y la larva temprana resultante de *S. taeniopterus*.

## Materiales y Métodos

Se recolectaron 20 ejemplares de *S. taeniopterus* mediante el uso del arte de pesca tipo nasas, colocándolas en las cercanías de la estación científica de la UDO

Dr. Fernando Cervigón en la isla de Cubagua, estado Nueva Esparta, Venezuela. Al ser extraídos se transportaron debidamente y fueron colocados en tanques de 900 L de capacidad ubicados en el Instituto de Investigaciones Científicas (IIC) de la UDONE en Boca del Río, estado Nueva Esparta.

Se verificó la madurez de los ejemplares de acuerdo a lo indicado por Medina *et al.* (2005), luego se obtuvieron los óvulos, se lavaron con abundante agua de mar filtrada en un tamiz de 25  $\mu\text{m}$  y seguidamente se colocaron en un recipiente de 50 litros de capacidad con agua de mar filtrada y aireación. Posteriormente, se reservaron para el diseño experimental.

Para la obtención de los espermatozoides, primero se secó la región urogenital a cada macho con el uso de toallas de papel absorbente, para evitar la posibilidad de activación o contaminación del esperma (Viveiros *et al.* 2001). Finalmente, se colectó el semen expulsado por el poro urogenital con una micropipeta y se colocó en tubos de microcentrífuga de plástico de 1,5 ml, donde una alícuota de 0,05 ml del semen de cada ejemplar se suspendió en una proporción 1:1 en Hidratarvin® previamente preparado de acuerdo a lo indicado en el empaque.

El diseño experimental consistió en dos tratamientos (métodos de preservación a corto plazo), a diferentes tiempos de fertilización, siendo contrastados por un control.

El primer tratamiento fue la preservación del semen obtenido a temperatura ambiente ( $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y el segundo preservado refrigerado a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ambos tratamientos se colocaron a prueba simultáneamente luego de diferentes tiempos de preservación espermática. Dichos tiempos de preservación para ambos tratamientos, fueron los siguientes: un control, el cual fue a las 0 h (sin preservar el semen); luego a las 12 h, 24 h y 36 h posteriores a la obtención del semen. Cada tiempo de preservación, incluyendo el control constó de tres réplicas para ambos tratamientos (Figura 1).

Con respecto a la fertilización, se realizó a razón de 10 óvulo/ml con una alta concentración de semen, mayor a  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Se estimó el porcentaje de fertilización y de eclosión en cada réplica, tiempo y tratamiento de preservación espermática respectivamente, mediante las siguientes fórmulas algebraicas:

- Porcentaje de Fertilización =  $((\text{NCC}/\text{NOT}) * 100)$
- Porcentaje de eclosión =  $((\text{NLE}/\text{NCS}) * 100)$

$$((\text{NLE}/\text{NCS}) * 100)$$

Donde:

NCC: número de cigotos contados

NOT: número de óvulos totales

NLE: número de larvas que eclosionaron

NCS: número de cigotos sembrados

Se realizaron, además, mediciones morfométricas de las larvas (5 por réplica), que incluyeron longitud total, longitud del notocordio, largo de la cabeza, ancho de la cabeza, volumen del saco vitelino y diámetro de la gota de aceite (Figura 2).

Lo anterior, se utilizó para verificar la existencia de diferencias significativas entre las réplicas, tiempos y tratamiento de preservación espermática a través de un ANOVA multifactorial anidado.

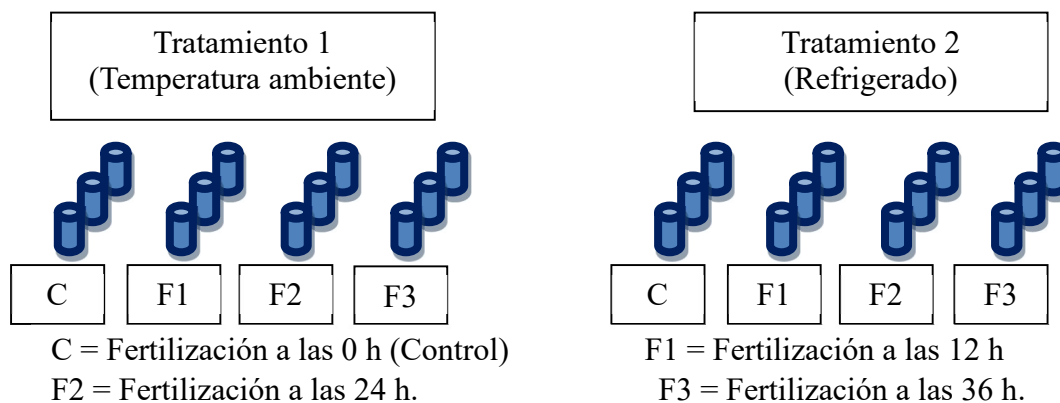


Figura 1. Representación gráfica del diseño experimental.

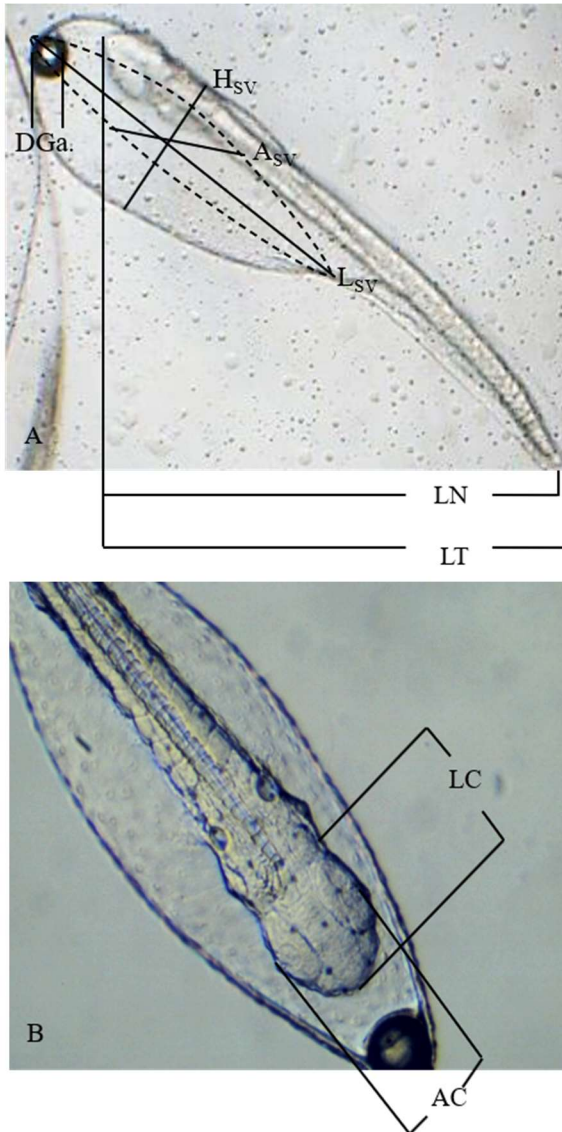


Figura 2. Medidas de la larva de *S. taeniopterus*. A) Asv: ancho del saco vitelino; Lsv: longitud del saco vitelino; HSV, alto del saco vitelino; DGa: diámetro de la gota de aceite; LN: largo de la notocorda; y LT: longitud total. B) LC: largo de la cabeza; y AC: ancho de la cabeza).

### Resultados

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el ANOVA multifactorial, para cada tiempo de preservación (valor  $-F = 0,0000$ ;  $P < 0,05$ ) y tratamiento (valor  $-F = 0,0002$ ;  $P < 0,05$ ) con respecto al

porcentaje de fertilización. Por el contrario, para cada réplica (valor  $-F = 0,2608$ ;  $P > 0,05$ ) no se observó diferencias. En general, el mayor porcentaje de fertilización se visualizó en el control; no obstante, dicho porcentaje en el semen preservado (T1 y T2) disminuyó significativamente a medida que aumento el tiempo de preservación espermática (Figura 3A). Por otro lado, se observó mayor porcentaje de fertilización en el semen refrigerado con relación al semen preservado a temperatura ambiente (Figura 3B).

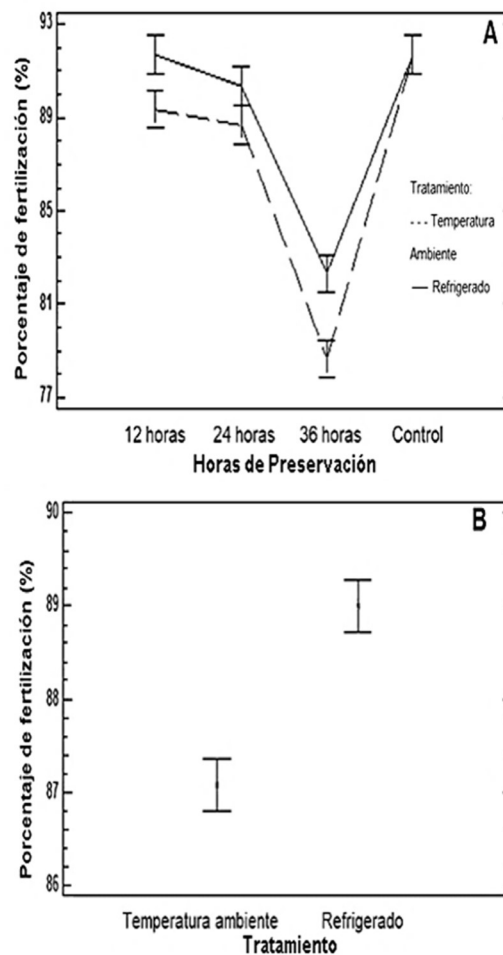


Figura 3. A) Porcentaje de fertilización de ambos tratamientos a cada tiempo de fertilización. B) Comparación de medias de los porcentajes de fertilización de ambos tratamientos.



Sólo se apreció eclosión de larvas en el control y en ambos tratamientos a las 12 h de preservación espermática. El ANOVA multifactorial no arrojó diferencias significativas con respecto al porcentaje de eclosión para cada réplica (valor –  $F = 0,3500$ ;  $P > 0,05$ ) tiempo de preservación (valor –  $F = 0,2697$ ;  $P > 0,05$ ) y tratamiento (valor –  $F = 0,2697$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 4).

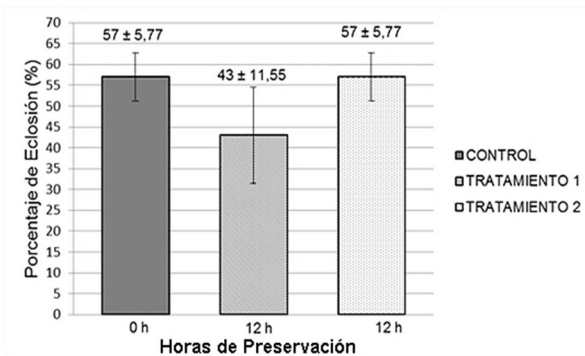


Figura 4. Porcentaje de Eclosión en cada tratamiento a las 12 h de preservación en contraste con el control.

En el ANOVA multifactorial, para cada réplica (valor –  $F = 0,0024$ ;  $P < 0,05$ ) tiempo de preservación (valor –  $F = 0,0046$ ;  $P < 0,05$ ) y tratamiento (valor –  $F = 0,0009$ ;  $P < 0,05$ ) con respecto a la longitud total y sus interacciones, se observaron diferencias estadísticamente significativas, indicando que las larvas pertenecientes al tratamiento con semen refrigerado presentan una longitud total mayor que las pertenecientes al semen a temperatura ambiente (Figura 5A), mientras que se observó menor longitud a las 12 h de preservación espermática con respecto al control (Figura 5B).

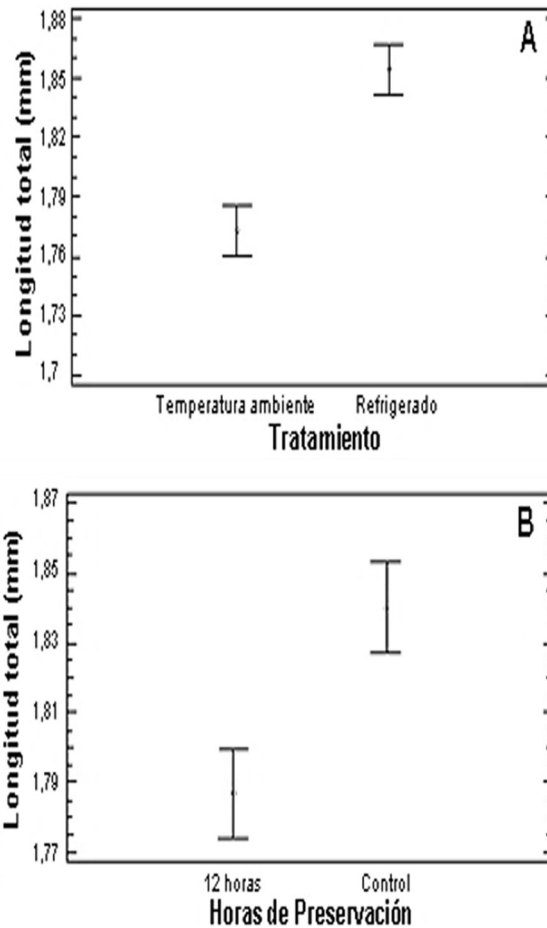


Figura 5. Comparación de medias de la longitud total. A) con relación a ambos tratamientos y B) con relación al tiempo de preservación.

El ANOVA multifactorial reveló diferencias significativas para cada réplica (valor –  $F = 0,0020$ ;  $P < 0,05$ ) y tratamiento (valor –  $F = 0,0006$ ;  $P < 0,05$ ) con respecto a la longitud del notocordio y sus interacciones, pero no mostró tales diferencias en el tiempo de preservación (valor –  $F = 0,1672$ ;  $P > 0,05$ ); por lo tanto, las larvas provenientes del tratamiento a temperatura ambiente presentaron una longitud del notocordio menor que las pertenecientes al semen refrigerado (Figura 6).

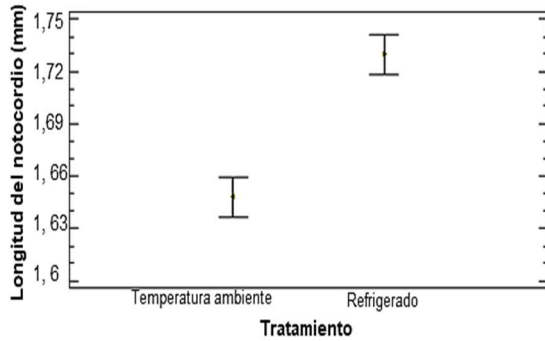


Figura 6. Comparación de medias de la longitud del notocordio en relación con ambos tratamientos.

### Discusiones

Lo hallado parece indicar que bajas temperaturas de almacenamiento prolongan el período viable de los espermatozoides, beneficiando sus patrones de motilidad al igual que su integridad en general, trayendo consigo, una mejor calidad espermática para el semen de *S. taeniopterus* refrigerado con relación al semen preservado a temperatura ambiente, comprometiendo directamente la capacidad de la célula para participar con éxito en los procesos de fertilización, eclosión y desarrollo embrionario, afectando la calidad morfológica de la larva (Maria *et al.* 2006; Valdebenito *et al.* 2009).

Aunque se observaron óptimos porcentajes de fertilización en este trabajo, la eclosión de larvas y su desarrollo se vio afectada por el tiempo de preservación espermática, esto se debe posiblemente a que ocurre la fragmentación del ADN espermático producto de la preservación, lo que puede influir fuertemente en el desarrollo normal del embrión y en la integridad de la larva (Gutiérrez, 2007).

### Conclusiones

La preservación espermática a bajas temperaturas y por un tiempo no mayor a 12 h, es una herramienta viable para la obtención de larvas saludables de *S. taeniopterus*.

### Referencias

- Aguilar-Juárez, M., Ruiz-Campos, G. and Paniagua-Chávez, C. 2014. Cold storage of the sperm of the endemic trout *Oncorhynchus mykiss nelsoni*: a strategy for short-term germplasm conservation of endemic species. *Rev. Mex. de Biodivers.* 85: 294 – 300.
- Annandale, S., Turner, J., Rooker, J. y Dance, M. 2013. Loro Seguimiento (*Scarus rubroviolaceus* y *S. psittacus*) utilizando telemetría acústica en un sistema de arrecifes de coral de Hawaii. *Proceedings of the 66th Gulf and Caribbean Fisheries Institute.* Corpus Christi, Texas, USA. 8: 257 – 258.
- Billard, R. 1990. Artificial insemination in fish. *Marshall's Physiology of Reproduction.* 9: 870-889.
- Bustamante-González, J., Rodríguez-Gutiérrez, M., Cortés-García, A., Arenas-Ríos, E., Figueroa-Lucero, G. y Ávalos-Rodríguez, A. 2019. Fisiología y criopreservación del espermatozoide en teleosteos. *Rev. AquaTIC* 53: 1-17.

- Carneiro, P. 2007. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(3): 361-366.
- Gutiérrez, R. 2007. Daño al AND espermático: aspectos clínicos y biológicos. *Rev. Cubana Endocrinol* 18 (2): 10.
- Maria, A., Viveiros, A., Freitas, R. and Oliveira, A. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*. 260:298-306.
- Marques S. and Pereira, H. 2004. Short-term cold storage of sperm from six neotropical Characiformes fishes. *Brazilian archives of Biology technology and International journal*. 47(5):799 – 804.
- Medina, V., Velasco, Y. y Cruz, P. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev. Col Cienc Pec*. 18(1): 34 -48.
- Mumby, P., Dahlgren, C., Harborne, A., Kappel, C., Micheli, F., Brumbaugh, D., Holmes, K., Mendes, J., Broad, K., Sanchirico, J., Buch, K., Box, S., Stoffle, R. and Gill, A. 2006. Fishing, trophic cascades, and the process of grazing on coral reefs. *Science* 311:98-101.
- Muñoz, M. 2011. Biotecnología aplicada en la reproducción de peces. *Informador Técnico, Colombia*. 75: 66 – 72.
- Poleo, G. y Mora, J. 2008. Ensayos preliminares a corto plazo de semen de los bagres yaque (*Leiarius marmoratus*) y sierra (*Oxidoras sifontesi*). *CIENCIA*. 16 (4): 396 – 401.
- Sahin, T., Kurtoglu, I. and Balta, F. 2013. Effect of different extenders and storage periods on motility and fertilization rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Universal Journal of Agricultural Research*. 3: 65 – 69.
- Trigo, P., Merino, O., Figueroa, E., Valdebenito, I., Sánchez, R. and Risopatrón, J. 2014. Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. *First international journal of andrology*. *Andrologia*. 20: 1 – 5.
- Valdebenito, I., Flecher, C., Vera, V. y Fernández, J. 2009. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Arch. Med. Vet*. 41: 97 – 106.
- Viveiros, A., Lock, E., Woelders, H. and Komen, J. 2001. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cryobiology*. 43: 276-287.
- Viveiros, M., Orfao, L., Oliveira, A. and Moraes, G. 2006. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Anim. Reprod*. 3(1): 55 – 60.